

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Petr Kašík

Vliv kurkuminu na karcinogenezi a tvorbu metastáz

The effect of curcumin on carcinogenesis and metastasis development

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Adéla Kábelová

Praha, 2018

Poděkování

Rád bych poděkoval své školitelce Mgr. Adéle Kábelové za nekonečnou trpělivost, klid a rady, které přispěly ke psaní této práce. Mé díky patří všem, kteří mě podporovali v rámci celého dosavadního studia.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného titulu.

V Praze, dne, 12. 8. 2018

Podpis

Seznam zkratek

Akt	AKR mice thymomas
AMPK	adenosine monophosphate-activated protein kinase
Apaf-1	apoptotic protease activating factor-1
AP-1	activator protein-1
ATF-2	activating transcription factor-2
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BRCA1	breast cancer 1
CDK	cyclin-dependent kinase
CFT	curcumin-free turmeric
COX-2	cyclooxygenase-2
EMT	epithelial-mesenchymal transition
ERK 1/2	extracellular signal-regulated kinases 1/2
FAK	focal adhesion kinase
Fas	first apoptosis signal
FGF	fibroblast growth factor
FoxM1	forkhead box protein M1
Her2	human epidermal growth factor receptor 2
HLJ1	DnaJ-like heat shock protein 1
HO-1	hemoxygenase-1
Il	interleukin
JAK	Janus kinase
LC-3	light chain-3
LKB1	liver kinase B1
MDM2	mouse double minute 2 homolog
MMP	matrix metalloproteinase
mTOR	mammalian target of rapamycin

NF-κB	nuclear factor-kappa B
PHLPP1	PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
PIAS-3	protein inhibitor of activated STAT-3
PKB	protein kinase B
PP1	protein phosphatase 1
RhoA	Ras homolog A
ROS	reactive oxygen species
ROCK	Rho-associated protein kinase
STAT	signal transducer and activator of transcription
TIMP	tissue inhibitor of matrix metalloproteinase
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TSP-1	thrombospondin-1
uPA	urokinase-type plasminogen activator
VEGF	vascular endothelial growth factor

Abstrakt

Kurkumin je polyfenol obsažený v kořenech rostliny *Curcuma longa*. Pleiotropní působení kurkuminu nachází v posledních letech uplatnění v prevenci a terapii řady onemocnění, včetně rakoviny. Tato bakalářská práce shrnuje současné poznatky týkající se působení kurkuminu v karcinogenezi a tvorbě metastáz. V rámci inhibice proliferace nádorových buněk může kurkumin zastavovat progresi buněčného cyklu, především regulací aktivity cyklinů a cyklin-dependentních kináz, jejich inhibitorů, případně aktivací nádorového supresoru p53. Zdá se, že p53 má současně důležitou úlohu v iniciaci vnitřní apoptotické dráhy, jejíž indukce byla v důsledku podání kurkuminu pozorována u řady nádorových buněčných linií. Apoptotické proteiny účastnící se indukce apoptózy kurkuminem dále zahrnují rodinu proteinu Bcl-2 a kaspázy. Potlačení angiogeneze, zvýšení oxidačního stresu nebo ovlivnění zánětlivé odpovědi jsou další mechanismy, kterými může kurkumin předcházet rozvoji nádorového onemocnění. V neposlední řadě může kurkumin inhibovat invazivitu a migraci nádorových buněk, zejména zvýšením transkripce E-kadherinu a snížení exprese matrixových metaloproteináz. Využití kurkuminu v běžné klinické praxi má však řadu limitů, jež lze obejít syntézou kurkuminových analogů či nanokurkuminu.

Klíčová slova

Kurkumin, rakovina, metastáze, apoptóza, p53, autofagie

Abstract

Curcumin is a polyphenol from the roots of plant *Curcuma longa*. Highly pleiotropic effect of curcumin has presently application not only in prevention, but also in treatment of various diseases including cancer. Therefore, this bachelor thesis aims to summarize the current knowledge concerning the effect of curcumin on carcinogenesis and metastasis development. Considering the inhibition of cancer cells proliferation, curcumin stops the progression of cell cycle, primarily via regulating the activity of cyclins and cyclin-dependent kinases, their inhibitory proteins or tumor suppressor protein p53. Additionally, p53 also seems to have an important role in the initiation of intrinsic apoptotic pathway, which was observed in many cancer cell lines after curcumin administration. Apoptotic proteins involved in apoptosis induction after curcumin application also comprise Bcl-2 family proteins and, caspases. Other mechanisms exerted by which curcumin prevent cancer development include suppression of angiogenesis, increase of oxidative stress or modulation of inflammatory response. Finally, curcumin also suppress cancer cells invasion and migration by enhancing the transcription of E-cadherin and decreasing of the transcription of matrix metalloproteinases. Because the application of curcumin in clinical practice has many limitations, curcumin analogues or nanocurcumin are synthesized to overcome them.

Key words

Curcumin, cancer, metastasis, apoptosis, p53, autophagy

1	Úvod	1
2	Kurkumin	3
3	Vliv kurkuminu na tvorbu a rozvoj primárního nádoru	4
3.1	Zastavení buněčného cyklu	5
3.1.1	Vliv aplikace kurkuminu na zastavení buněčného cyklu	5
3.2	Apoptóza	6
3.2.1	Protein p53	7
3.2.1.1	Vliv aplikace kurkuminu na p53	7
3.2.1.1.1	Vliv aplikace kurkuminu na genovou expresi p53	7
3.2.1.1.2	Vliv aplikace kurkuminu na aktivaci p53	8
3.2.2	Proteiny rodiny Bcl-2	9
3.2.2.1	Vliv aplikace kurkuminu na proteiny rodiny Bcl-2.....	9
3.2.3	Kaspázy	10
3.2.3.1	Vliv kurkuminu na kaspázu 9 (aktivace vnitřní apoptotické dráhy)	10
3.2.3.2	Působení kurkuminu na kaspázy 8 a 10	11
3.3	Autofagie	12
3.3.1	Autofagie a signální dráha PI3K	12
3.3.2	Vliv kurkuminu na autofagii	13
3.3.2.1	Vliv kurkuminu na signální dráhu PI3K a ERK1/2	13
3.4	Další mechanismy ovlivňující karcinogenezi	14
3.4.1	Angiogeneze	14
3.4.1.1	Vliv kurkuminu na angiogenezi	14
3.4.2	Oxidační stres a produkce ROS	15
3.4.2.1	Antioxidační působení kurkuminu	15
3.4.2.2	Vliv kurkuminu na produkci ROS.....	15
3.4.3	Vliv kurkuminu na další proteiny	16
3.4.3.1	Vliv kurkuminu na funkci proteinů STAT	16
3.4.3.2	Vliv kurkuminu na NF-κB a interleukiny	17
4	Invazivita nádorových buněk a tvorba metastáz	17
4.1	Kadheriny	18
4.1.1	Vliv kurkuminu na kadheriny	18
4.2	Matrixové metaloproteinázy	19
4.2.1	Vliv kurkuminu na MMP	19

5	Syntetické analogy kurkuminu a nanokurkumin	20
5.1	Syntetické analogy kurkuminu.....	20
5.2	Nanokurkumin.....	21
6	Závěr	22
7	Seznam literatury	23

1 Úvod

Nádorová onemocnění patří, spolu s onemocněními kardiovaskulárního systému, mezi nejčastější příčiny úmrtí v rozvinutých zemích. Každým rokem je rakovina diagnostikována u více než patnácti milionů jedinců, přičemž téměř polovina případů končí úmrtím. V následujících letech by se dle předpokladů měla incidence nádorových onemocnění dále zvyšovat. V důsledku toho je zde potřeba precizního porozumění vlastnímu procesu vzniku nádorového onemocnění, jakožto i možností jejich terapie, které by pomohly snížit mortalitu a zlepšit kvalitu života onkologických pacientů.

Přestože výzkum terapie nádorových onemocnění během posledních let značně pokročil, spolehlivá léčba zatím chybí. U většiny typů nádorů je nejúčinnější terapeutickou metodou chirurgická léčba, která je často doplněna ozařováním a chemoterapií. Využití zmíněných metod má však řadu limitů, zahrnující lokalizaci či rozsah primárního nádoru, rezistenci nádorových buněk k použitému chemoterapeutiku nebo vedlejší účinky rozvíjející se v důsledku protinádorové terapie. V budoucnu by lepších terapeutických výsledků mohlo být dosaženo pomocí biologické léčby či imunoterapie, které zatím nejsou běžnou součástí klinické praxe a jejichž použití se omezuje na některé typy nádorů.

V současné době nacházejí některé biologicky aktivní látky obsažené v potravě, tzv. nutraceutika, využití v prevenci i terapii nádorových onemocnění. Jedná se převážně o látky rostlinného původu ze skupiny polyfenolů, terpenů, alkaloidů či flavonoidů, které specificky působí proti maligní transformaci. Řada těchto látek brání rozvoji nádorového onemocnění antioxidačním, protizánětlivým nebo imunostimulačním působením, inhibicí buněčné proliferace a indukováním buněčné smrti. Výhodou použití nutraceutik v terapii nádorových onemocnění je jejich nízká toxicita a menší množství vedlejších účinků.

Jedním z nutraceutik s protinádorovým působením je kurkumin, který je předmětem této bakalářské práce. Působení kurkuminu na molekulární úrovni *in vitro* u různých nádorových linií bylo dokumentováno v řadě studií. Jeho efekt *in vivo* podmínkách byl testován na zvířecích modelech a v některých případech i v rámci klinických studií s pacienty.

Hlavním cílem bakalářské práce je shrnutí současných poznatků týkajících se vlivu kurkuminu na proces karcinogeneze a tvorbu metastáz. Diskutováno bude působení

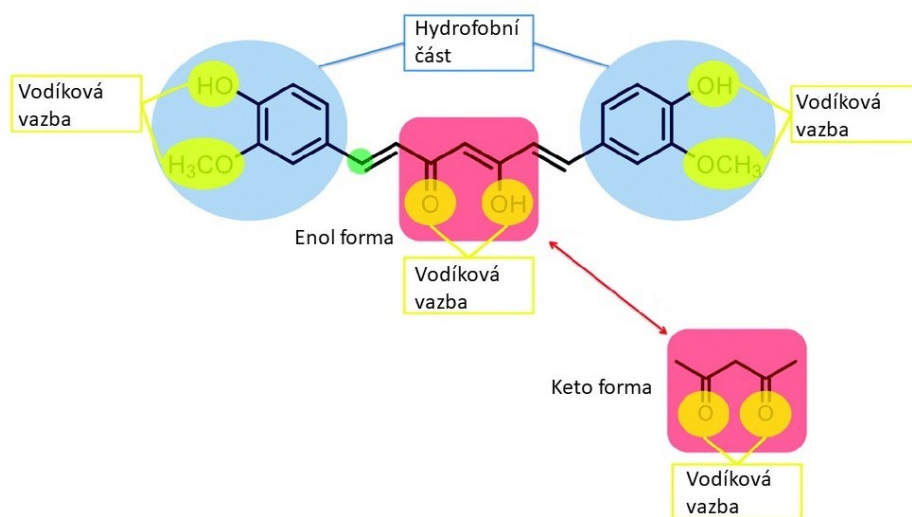
kurkuminu v souvislosti s inhibicí progresu buněčného cyklu a indukci buněčné smrti, se zaměřením na konkrétní proteiny a signální dráhy, které ovlivňuje. Zmíněny budou i další mechanismy nádorové transformace, na které kurkumin působí, jako je oxidační stres a tvorba nových cév (angiogeneze). V neposlední řadě se práce zabývá vlivem kurkuminu na invazivitu a migraci nádorových buněk. Pozornost bude věnována i některým syntetickým analogům kurkuminu.

2 Kurkumin

Kurkumin je polyfenol, který tvoří hlavní biologicky aktivní složku kurkumy, koření získávaného z kořenů rostliny Kurkumovník dlouhý (*Curcuma longa*) z čeledi *Zázvorovitých* (*Zingiberaceae*). V dnešní době se kurkuma používají v potravinářském průmyslu jako barvivo či příměs koření a dochucovadel. Dříve, zejména v Asii, byla kurkuma po staletí využívána v léčitelství při onemocněních kůže nebo trávicího traktu. Díky širokému spektru účinků, které zahrnuje antioxidační antimikrobiální, protizánětlivé, imunomodulační či protinádorové působení, se kurkumin uplatňuje v prevenci a terapii řady dalších chorob včetně diabetu, obezity, kardiovaskulárních a neurodegenerativních onemocnění a v neposlední řadě i rakoviny (shrnutí v Gupta *et al.*, 2013; Kunnumakkara *et al.*, 2017).

Pleiotropní efekt kurkuminu, je dán specifickou molekulární strukturou. Z chemického hlediska je kurkumin diferuloyl methan neboli 1, 7-bis[(4-hydroxy-3-methoxyfenol)-1, 6-heptadien-3, 5-dion], jehož převážně hydrofobní molekula se skládá ze dvou zbytků kyseliny ferulové spojených methylenovým můstkem. V rámci *in silico* analýzy bylo zjištěno, že molekula kurkuminu je vysoce flexibilní. Zaujímá různé konformace a maximalizuje tak hydrofobní vazby s proteiny se kterými interaguje. Fenolické a karbonylové funkční skupiny, které jsou lokalizovány na vnějších okrajích a ve středu molekuly kurkuminu, mohou současně vytvářet vodíkové vazby a s vysokou afinitou přímo vázat i molekuly DNA či RNA. Přesmyk mezi keto a enol formou (tautomerizace), z nichž enol forma je výrazně preferována za všech podmínek, poskytuje kurkuminu schopnost fungovat současně jako akceptor i donor vodíkové vazby, případně vytvářet s některými molekulami kovalentní vazby (shrnutí v Gupta *et al.*, 2011), (viz obr 1).

Potenciální použití kurkuminu v terapii nádorových onemocnění by mohlo být, v porovnání s klasickou chemoterapií, výhodné zejména kvůli jeho nízké toxicitě. Na druhou stranu, využití kurkuminu v běžné lékařské praxi je limitováno omezenou absorpcí v trávicím traktu, rychlou eliminací z organismu, případně nízkou stabilitou v *in vivo* podmínkách. Tyto vlastnosti kurkuminu lze, alespoň částečně překonat, pomocí řady syntetických analogů kurkuminu či konjugantů kurkuminu s různými typy nosičů (viz kapitola 5.1. a 5.2), (shrnutí v Gupta *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2013).



Obr 1. Chemická struktura molekuly kurkuminu. Znázorněna je tautomerizace mezi keto a enol formou (červeně). Na obrázku je také zobrazena schopnost molekuly kurkuminu tvořit vodíkové vazby (žlutě), (převzato a upraveno z Salem, Rohani and Gillies, 2014).

3 Vliv kurkuminu na tvorbu a rozvoj primárního nádoru

Vznik nádorového onemocnění je mnohastupňový proces, při kterém dochází k přeměně normální buňky na buňku nádorovou v důsledku kumulace mutací ve specifických genech. Ty zahrnují skupinu onkogenů, respektive protoonkogenů, jejichž produkty stimulují buněčnou proliferaci a dále nádorových supresorů, které buněčné dělení potlačují, například indukci apoptózy (viz kap. 3.2). Nádorová transformace buňky má několik stádií. V iniciačním stádiu se objevuje prvotní mutace genetické informace. Ve stádiu promoce buňky intenzivněji proliferují, ale vyvolání samotné maligní transformace nastane až ve stádiu progresu. Tehdy se hromadí další genetické změny, jejichž výsledkem je především neregulovatelný buněčný růst a dělení.

Růst primárního nádoru je, mimo jiné, podmíněn tvorbou nových krevních kapilár (angiogenezí), které nádorovým buňkám zajišťují dostatečný přísun růstových faktorů, kyslíku a odvádějí toxické metabolity. V důsledku určitých genetických změn se u buněk

primárního nádoru může rozvinout schopnost invadovat do extracelulární matrix, migrovat krevními či lymfatickými cévami po organismu a zakládat sekundární nádorová ložiska tzv. metastázy (viz kap. 4), (Lu, Weaver and Werb, 2012). Protinádorové působení kurkuminu v jednotlivých fázích vzniku a rozvoje nádorového onemocnění bude popsáno v následujících kapitolách.

3.1 Zastavení buněčného cyklu

Buněčný cyklus je sled koordinovaných procesů, kterými prochází dělicí se eukaryotická buňka. Je tvořen interfází, která se dělí na G1, S, a G2 fázi, během nichž dochází k buněčnému růstu, replikaci DNA a přípravám na buněčné dělení. Buněčný cyklus je přísně regulován a obsahuje řadu kontrolních bodů, jejichž smyslem je mj. zabránit dělení poškozených buněk, které by mohlo vést k nádorové transformaci. U nádorových buněk je buněčný cyklus prakticky vždy deregulován a inhibice progresu buněčného cyklu, je tedy cílem některých protinádorových léčiv včetně kurkuminu. Zdá se, že v souvislosti s aplikací kurkuminu dochází k zastavení cyklu v G1 i G2 fázi (shrnutí v Sa and Das, 2008). V nádorových buňkách jsou často zvýšené hladiny CDK a cyklinů.

Cyklin-dependentní kinázy (CDK, cyclin-dependent kinase), které patří do rodiny serin/threonin kináz, jsou hlavními regulátory přechodů mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu. Dosud bylo identifikováno devět CDK, z nichž každá reguluje specifickou fázi buněčného cyklu, např. G1 fázi (CDK-2, CDK-4 a CDK-6), S fázi (CDK-2), G2 a M fázi (CDK-1). Kinázová aktivita CDK je regulována cykliny, jejichž hladina kolísá během buněčného cyklu, a které periodicky aktivují CDK. (shrnutí v Canavese, Santo and Raje, 2012).

3.1.1 Vliv aplikace kurkuminu na zastavení buněčného cyklu

V G1 fázi byly po aplikaci kurkuminu zastaveny buňky retinoblastomu snížením exprese cyklinu D a CDK-2 a -6 (Yu *et al.*, 2016) či karcinomu prsu, u kterého byla zároveň snížena produkce cyklinu E a A, které se společně s CDK-2 podílejí na regulaci přechodu do S fáze (Zhou *et al.*, 2011). Snížená produkce cyklinů a CDK byla u obou linií doprovázena zvýšenou aktivitou p38, který zároveň aktivuje inhibitory CDK p21 a p27.

Přibližně u 25 % pacientů s rakovinou prsu je protinádorová terapie komplikována nadprodukcí proteinu Her2 (human epidermal growth factor receptor 2). U buněčné linie

MDA-MB-231 transfekované proteinem Her2 docházelo po aplikaci kurkuminu ke snížení jeho produkce a inhibice p27. V důsledku toho docházelo k inhibici CDK a cyklinu E a zastavení buněčného cyklu (Sun *et al.*, 2012).

Terapie kurkuminem má smysl i u pacientů, kteří trpí odlišnými typy nádoru prsu. U buněčné linie MCF-7 karcinomu prsu, která se od buněk MDA-MB-231 liší přítomností progesteronového a estrogenového receptoru, bylo zastavení buněčného cyklu v G2 fázi způsobeno sníženou produkcí cyklinu B a CDK-2. Pravděpodobně se tak dělo prostřednictvím inhibice signální dráhy PI3K/Akt. Role proteinu Akt byla následně patrná v rozdílu mezi buněčnou linií MCF-7 a mutantní linií MCF-7/Bcl2+, která produkovala zvýšené množství proteinu Bcl-2 (viz kap. 3.2.2). Zatímco u standardní linie docházelo k zastavení buněčného cyklu pouze pomocí kurkuminu, u mutantní linie musely být použity doplňující inhibitory Akt, aby k zastavení proliferace došlo (Berrak *et al.*, 2016).

K zastavení v G2 fázi docházelo po podání kurkuminu u různých linií myeloidní leukemie prostřednictvím inhibice cyklinu B a příslušných CDK doprovázené zvýšenou genovou expresí p21 a p27. A dále inaktivací protoonkogenu FoxM1 (forkhead box protein M1), který byl nejvíce exprimován v G2/M fázi a indukoval expresi cyklinu B (Zhang *et al.*, 2014). Zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi bylo pozorováno i na nádorových buňkách močového měchýře, avšak exprese cyklinů a CDK nebyla překvapivě ovlivněna (Park *et al.*, 2006).

3.2 Apoptóza

Apoptóza je jedním z typů programované buněčné smrti, kterými jsou eliminovány buňky pro organismus dále nepotřebné, buňky napadené viry, případně buňky s poškozenou DNA, které by mohly projít nádorovou transformací a vést k nádorovému onemocnění. K iniciaci apoptózy dochází vnější nebo vnitřní apoptotickou dráhou. Vnější apoptotickou dráhu aktivuje interakce ligandu a příslušného receptoru v plasmatické membráně buňky. Iniciace vnitřní apoptotické dráhy je regulována intracelulárními proteiny, např. proteinem p53 či proteinů rodiny Bcl-2 (viz kap. 3.2.1 a 3.2.2). Indukce vnitřní či vnější apoptotické dráhy následně vede k aktivaci proteolytických enzymů, tzv. kaspáz (viz kap. 3.2.3), které realizují rozpad buňky (shrnuť v Elmore, 2007). Vzhledem k tomu, že indukce apoptózy je proces bránící rozvoji nádorového onemocnění, bude v následujících kapitolách popsána úloha kurkuminu v indukci apoptózy.

3.2.1 Protein p53

Poškození molekuly DNA, ale i další typy intracelulárních stresových stimulů mohou v buňce aktivovat transkripční faktor p53, který po translokaci do jádra iniciuje transkripci příslušných responzivních genů. V závislosti na typu a rozsahu buněčného poškození může v důsledku aktivace p53 docházet k zastavení buněčného cyklu, což umožní buňce poškození opravit. V případě, že jsou poškození DNA neopravitelná dochází k indukci vnitřní apoptotické dráhy. Vzhledem k tomu, že indukce apoptózy aktivací proteinu p53 brání nádorové transformaci, mohou být terapeutické metody ovlivňující aktivitu p53 velice efektivní (shrnutí v Levine, 1997).

3.2.1.1 Vliv aplikace kurkuminu na p53

U nádorových buněk kurkumin zpravidla zvyšuje genovou expresi a fosforylaci p53. Aktivační fosforylace p53 probíhá na serinech a threoninech různými kinázami. Po aplikaci kurkuminu se zdá být nejdůležitější fosforylace serinu 15 pomocí AMPK (adenosin monophosphate-activated protein kinase), která brání interakci p53 a jeho negativního regulátoru MDM2 (mouse double minute homologue 2), (viz obr. 2), (Imamura *et al.*, 2001). Mutace v serinu 15 způsobuje sníženou schopnost fosforylace p53, snižuje jeho cytosolickou koncentraci a snižuje tak úspěšnost reparací DNA pomocí p53 o 50 % (Shieh *et al.*, 1997).

3.2.1.1.1 Vliv aplikace kurkuminu na genovou expresi p53

Zvýšení genové exprese p53 po terapii kurkuminem bylo pozorováno u nádoru vaječníku (Shi *et al.*, 2006), karcinomu prsu (Choudhuri *et al.*, 2002) nebo neuroblastomu (Liontas and Yeger, 2004). U všech zmíněných nádorů byla zvýšená produkce p53 doprovázena aktivací dalších apoptotických proteinů jako je např. Bax (viz kap. 3.2.2.1) a indukci apoptózy nádorových buněk.

Zajímavé je, že ke zvýšení apoptotické aktivity nádorových buněk přispělo i snížení exprese p53, konkrétně u buněk nádoru tlustého střeva mutovaných v p53 (Shehzad *et al.*, 2013). Fakt, že gen pro protein p53 je u nádorových buněk vůbec nejčastěji mutovaným, může limitovat užití kurkuminu v nádorové terapii, neboť k apoptóze indukované přes p53 nebude docházet (Choudhuri *et al.*, 2005). Na druhou stranu

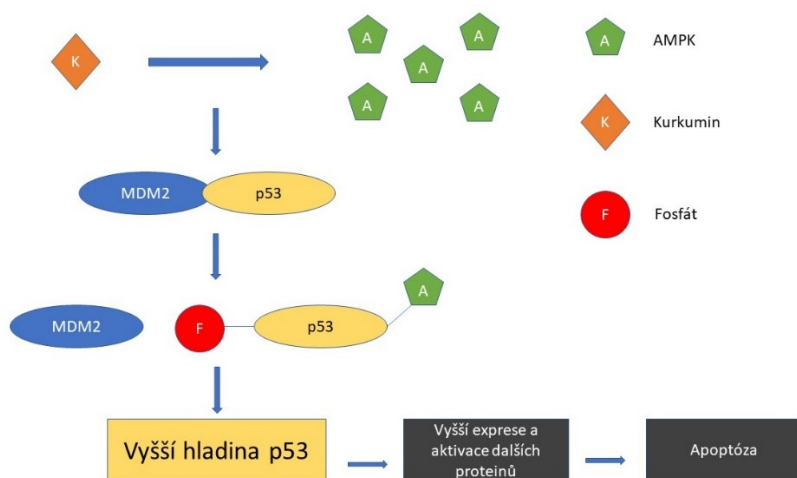
aplikace kurkuminu na nádorovou linii tlustého střeva nesoucí mutantní alelu p53 k indukci apoptózy vedla (Watson *et al.*, 2010).

3.2.1.1.2 Vliv aplikace kurkuminu na aktivaci p53

Aktivace AMPK po aplikaci kurkuminu nastala v důsledku fosforylace podjednotky AMPK α na threoninu 172 (Liontas and Yeger, 2004) nebo nepřímo pomocí kurkuminem fosforylovaného p38. Je pravděpodobné, že kurkumin ovlivňoval i jiné proteiny aktivující AMPK jako je např. LKB1 (liver kinase B1), (Pan *et al.*, 2008). Fosforylace p53 může být doprovázena také dalšími faktory ovlivňujícími následnou apoptózu, jako tomu bylo u nádoru plic, kde kurkumin poškozoval DNA a inhiboval proteiny, které ji opravovaly, jako např. BRCA1 (breast cancer 1) a O6-metylguanin DNA, čímž činil buňky citlivější k následné léčbě (Ting *et al.*, 2015).

Míra fosforylace p53 závisí na jednotlivých nádorových buněčných liniích. Aplikací kurkuminu na buňky adenokarcinomu tlustého střeva HT-29, bylo dosaženo zvýšené fosforylace p53 (Song *et al.*, 2005). Avšak když byly použity linie SW480 nebo SW620, které nadměrně exprimují mutantní p53, snižoval kurkumin aktivitu p53, ale apoptóza stále probíhala přes signální dráhu AMPK/mTOR (Sato *et al.*, 2017).

U buněk RKO kurkumin dokonce zabraňoval vytvoření správné konformace nemutovaného p53 inhibicí thioredoxin reduktázy (Moos *et al.*, 2004).



Obr. 2 Vliv kurkuminu na protein p53. Zvýšená aktivita AMPK vyvolaná aplikací kurkuminu inhibuje interakci proteinu MDM2 a p53, což brání degradaci p53 v proteazomu. Zvýšení cytosolické hladiny aktivovaného p53 může následně indukovat apoptózu (převzato a upraveno z Singh *et al.*, 2015).

3.2.2 Proteiny rodiny Bcl-2

Proteiny rodiny Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) jsou regulační proteiny účastníci se iniciace vnitřní apoptotické dráhy. Proteiny rodiny Bcl-2 lze rozdělit na proapoptotické a antiapoptotické. Proapoptotické proteiny mohou být efektorové (Bak, Bax) zvyšující propustnost vnější mitochondriální membrány pro cytochrom c, který aktivuje kaspázu 9 (viz kap. 3.2.3) a tzv. BH-3 only proteiny (Bad, Bim, Bid), které indukují oligomerizaci efektorových proteinů a často inhibují antiapoptotické proteiny Bcl-2 rodiny. Antiapoptotické proteiny (Bcl-2 a jeho homology BH1-4, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1) zachovávají integritu vnější mitochondriální membrány inhibicí proapoptotických efektorových proteinů (shrnutí v Chipuk *et al.*, 2010).

3.2.2.1 Vliv aplikace kurkuminu na proteiny rodiny Bcl-2

Aplikace kurkuminu snižovala produkci antiapoptotických a zvyšovala produkci proapoptických proteinů rodiny Bcl-2. Výhoda spočívá v nezávislosti na p53 (viz kap. 3.2.1), který v řadě nádorových buňkách nefunguje správně (Pillai *et al.*, 2004).

Aplikace kurkuminu ovlivňovala obě skupiny proteinů současně. U rakoviny prostaty (Yang *et al.*, 2015) a karcinomu prsu (Zhou *et al.*, 2017) se snižovala hladina Bcl-2 a zvyšovala hladina Bax (viz kap. 3.2.2). Zajímavé je, že pokud byly buňky transfekovány proteiny Bcl-2 a Bcl-xL, účinek kurkuminu na mitochondrie byl inhibován, hladina cytochromu c v cytosolu se snížila a k apoptóze nedocházelo (Anto *et al.*, 2002). V případě rakoviny prostaty a prsu bylo pozorováno, že k inhibici Bcl-2 dochází inhibicí exprese Akt (AKR mice thymomas; PKB, protein kinase B) nebo snížením fosforylace Akt, jako se tomu děje u rakoviny hrtanu. Navíc se zdá, že kurkumin u nádoru hrtanu zvyšoval hladinu miRNA-15a (Mou *et al.*, 2017) a u nádorů prsu dokonce i miRNA-16, které inhibovaly expresi Bcl-2 (Yang *et al.*, 2010).

Na myším modelu kolorektálního karcinomu navíc překvapivě docházelo k inhibici exprese Bcl-2 a Bcl-xL a indukci apoptózy v případě podání kurkumy bez obsahu kurkuminu, tzv. CFT (curcumin-free turmeric). To mohlo být způsobeno přítomností dalších bioaktivních molekul v kurkumě (Prasad *et al.*, 2017). Kurkumin by mohl fungovat i jako podpora chemoterapeutické léčby, jak bylo sledováno u karcinomu prsu, kde snižoval expresi Bcl-2 a Bcl-xL, což snižovalo rezistenci nádorových buněk k mytomycinu C (chemoterapeutikum), (Zhou *et al.*, 2017).

3.2.3 Kaspázy

Kaspázy jsou proteiny z rodiny cysteinových proteáz, které specificky štěpí peptidové vazby substrátů za aspartátem. Realizují rozklad buňky a lze je standardně rozdělit do tří skupin, tj. na iniciační (kaspáza 2, 8, 9, 10), efektorové (kaspáza 3, 6 a 7) a zánětlivé (kaspáza 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14). Kaspázy jsou syntetizovány jako inaktivní proenzymy (prokaspázy), které se aktivují až v průběhu apoptózy, a které mimo jiné indukují kondenzaci a fragmentaci chromatinu a rozpad buňky na apoptotická tělíska. Aktivace kaspáz je zprostředkována pomocí receptorů Fas (first apoptosis signal receptor) nebo TNFR (tumor necrosis factor receptor), které vážou iniciační kaspázu 10 resp. 8 nebo pomocí mitochondriální dráhy, kdy různé stimuly způsobují uvolnění cytochromu c z mitochondrie a v komplexu s Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) se aktivuje kaspáza 9. Iniciační kaspázy poté aktivují kaspázy 3, 6 a 7 (viz obr. 3), (shrnutí v Fan *et al.*, 2005).

3.2.3.1 Vliv kurkuminu na kaspázu 9 (aktivace vnitřní apoptotické dráhy)

Kurkumin je hydrofobní molekula, která snadno proniká membránou, a předpokládá se tedy především indukce vnitřní apoptotické dráhy, která závisí na aktivitě kaspázy 9.

Zvýšení genové exprese či aktivity kaspázy 9 bylo pozorováno u nádoru štítné žlázy (Zhao *et al.*, 2015) či rakoviny plic (Xu *et al.*, 2015). U rakoviny plic byla indukce apoptózy, v důsledku větší genové exprese kaspázy 9, dále zvýšena současným podáním karboplatiny, která patří mezi běžně užívaná cytostatika (Kang *et al.*, 2015). Zvýšení genové exprese kaspázy 9 a následné zmenšení primárního nádoru bylo v souvislosti s podáním kurkuminu, pozorováno i v *in vivo* podmínkách v kombinaci s oxaliplatinou u myšího modelu s kolorektálním karcinomem (Guo *et al.*, 2015).

K větší aktivitě kaspázy 9 docházelo po aplikaci kurkuminu různými mechanismy. U buněk lymfomu indukoval kurkumin poškození DNA rozrušením Rad51- dependentní homologní rekombinace, která je zásadní pro opravu dvouřetězcových zlomů DNA, čímž docházelo k aktivaci kaspázy 9 (Zhao *et al.*, 2018). Studie Hu a kol. (2015) sledovala vliv kurkuminu na buňky karcinomu hlavy a krku *in vitro* i *in vivo*. Po aplikaci kurkuminu byla zvýšena exprese genu pro Sirtuin 1, který pomocí protein kinázy ATM fosforyloval proteiny aktivující vnější i vnitřní apoptotickou dráhu zvýšením aktivit kaspáz 8 a 9.

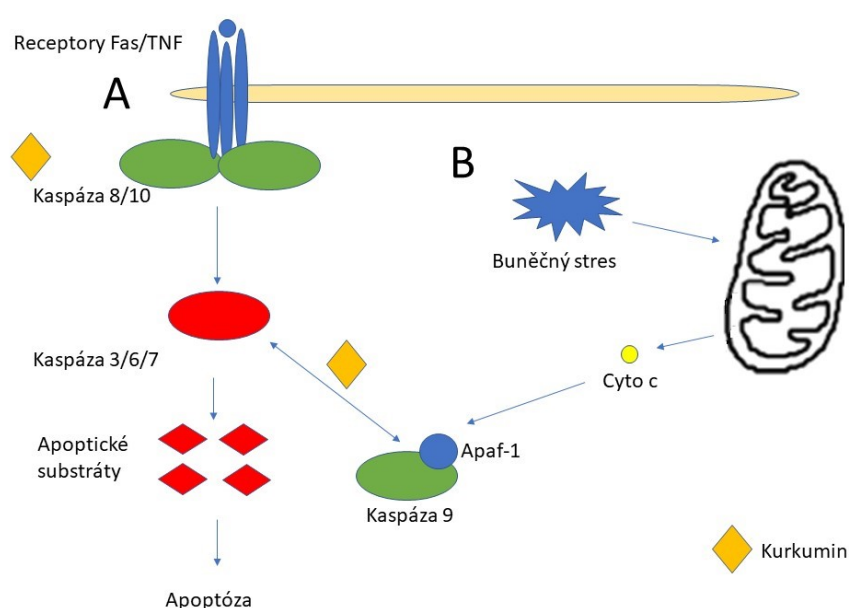
3.2.3.2 Působení kurkuminu na kaspázy 8 a 10

Zvýšená exprese a aktivita kaspáz vnější apoptotické dráhy nebyly pozorovány tak často. Vzhledem k provázanosti aktivace jednotlivých kaspázových kaskád se u některých buněčných linií může zdát, že kurkumin aktivoval vnější dráhu, i když tomu tak nebylo.

Vyšší aktivita kaspázy 8 byla patrná u buněk karcinomu prsu (Quispe-Soto and Calaf, 2016) nebo maligního mezoteliomu (Masuelli *et al.*, 2017), což by Zvýšená hladina mohlo naznačovat, že se kurkumin podílí na vnější apoptotické dráze. Avšak u buněk HL-60 myeloidní leukemie byla větší aktivita kaspázy 8 po aplikaci kurkuminu znatelná i s blokováním receptorem Fas. Je tak patrné, že kurkumin zde vnější apoptotickou dráhu neovlivňoval (Anto *et al.*, 2002).

Po aplikaci kurkuminu na buňky plicního adenokarcinomu, se zvyšovala i aktivita kaspázy 10, která byla s největší pravděpodobností zapříčiněna zvýšenou expresí miRNA-186 indukovanou kurkuminem (Zhang *et al.*, 2010).

Kurkumin se tedy podílí především na aktivaci vnitřní apoptotické dráhy. V regulaci výhradně iniciačních nebo efektorových kaspáz může záležet na typu nádoru.



Obr. 3 Schéma drah aktivace kaspáz. A. Vazba ligandů na receptory Fas a TNF (vnější apoptotická dráha) umožňuje navázání prokaspáz 8 a 10 a jejich štěpení na aktivní formu. Tyto kaspázy aktivují efektorové

kaspázy 3/6/7. **B.** Díky zvýšenému buněčnému stresu se aktivuje vnitřní apoptotická dráha a uvolněním cytochromu c z mitochondrií se formuje komplex kaspázy 9 s Apaf-1, který posléze aktivuje efektorové kaspázy. Obousměrná šipka u efektorových kaspáz 3, 6, 7 a iniciační kaspázy 9 značí pozitivní zpětnou vazbu. Pro přehlednost nejsou znázorněny některé amplifikační dráhy (převzato a upraveno z Fan et al., 2005).

3.3 Autofagie

Autofagie je evolučně vysoce konzervovaný buněčný proces, při kterém dochází k lysosomální degradaci proteinů za účelem recyklace buněčného materiálu. Rozlišit lze tři základní typy autofagie; mikroautofagii, makroautofagii a autofagii zprostředkovanou chaperony. V rámci této práce bude pozornost věnována makroautofagii, pro kterou je charakteristický vznik autofagozomů, membránových útvarů s buněčným materiálem, které následně fúzí s lysozomy za vzniku autolysozomů, v nichž probíhá degradace proteinů. Tvorbu autofagozomů lze nejčastěji detekovat na základě zvýšené exprese markerového proteinu Beclinu 1 a konverze forem proteinů LC-3 (light chain-3) nebo Beclin 1 (shrnutí v Janku *et al.*, 2012)

Pomocí autofagie si buňka dokáže za nepříznivých podmínek opatřit potřebné nutrienty a může být i jedním z typů programované buněčné smrti. Na rozdíl od apoptózy, která je zprostředkována fragmentací a kondenzací DNA, zůstává jádro během autofagické buněčné smrti intaktní až do její pozdní fáze. V řadě patologických situací, včetně nádorových onemocnění, indukuje autofagie buněčnou smrt. Kurkumin spouští autofagii především inhibicí dráhy PI3K/Akt/mTOR a v některých případech aktivace dráhy ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2), (shrnutí v Levine and Kroemer, 2008).

3.3.1 Autofagie a signální dráha PI3K

Fosfatidylinositol-3-kináza (PI3K; phosphatidylinositol-3-kinase) patří do rodiny kináz fosforylujících lipidy, které ovlivňují široké spektrum buněčných funkcí. V rámci indukce PI3K signální dráhy dochází k fosforylaci inositolového kruhu fosfatidylinositolů, což vede, prostřednictvím působení druhých posílů, k aktivaci proteinkinázy B. PKB pak následně aktivuje protein mTOR (mammalian target of rapamycin), serin/threonin protein kinázu, která mimo jiné reguluje buněčnou proliferaci, syntézu proteinů a v neposlední řadě také autofagii. U nádorových buněk často dochází ke zvýšení aktivity

této signální dráhy. Cílem protinádorových léčiv je proto dráhu PI3K/mTOR inhibovat a stimulovat autofagii (shrnutí v Janku *et al.*, 2012). Po aplikaci kurkuminu byla s inhibicí dráhy PI3K často pozorována aktivace dráhy ERK1/2.

3.3.2 Vliv kurkuminu na autofagii

Po aplikaci kurkuminu byla pozorována vyšší míra autofagie a zastavení progresu nádorových buněk např. u karcinomu ústní dutiny (Kim *et al.*, 2012) nebo pleurálního mezoteliomu (Yamauchi *et al.*, 2012) U karcinomu ledvin vedla autofagie k buněčné smrti až po podání vysoké dávky kurkuminu. Při aplikaci nízké dávky se autofagie chovala k nádorovým buňkám protektivně (Deng *et al.*, 2018). U buněk astrocytomy nebyla detekována přítomnost markerových proteinů a autofagie neprobíhala. I přesto tyto buňky podléhaly jinému typu buněčné smrti (Romero-Hernández *et al.*, 2013).

3.3.2.1 Vliv kurkuminu na signální dráhu PI3K a ERK1/2

Aplikace kurkuminu ovlivňovala různými způsoby aktivitu a expresi genů jejichž proteiny jsou součástí signální dráhy PI3K/Akt/mTOR. Inhibicí aktivity proteinů Akt, mTOR a P70S6K, které jsou součástí signální dráhy PI3K docházelo ke zvýšení míry autofagie a buněčné smrti např. u buněk melanomu (Zhao *et al.*, 2016) nebo maligního gliomu (Aoki *et al.*, 2007). Ke snížení aktivity Akt a mTOR docházelo zvýšenou aktivitou AMPK (viz kap. 3.2.1), která zde aktivuje signální dráhy vedoucí k defosforylaci Akt a mTOR (Guan *et al.*, 2016). Zajímavé je, že u buněk kolorektálního karcinomu docházelo po aplikaci kurkuminu ke zvýšení aktivity Akt inhibicí jeho fosfatázy PHLPP1 (PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase), ale autofagie nadále probíhala díky kurkuminem inhibované aktivitě proteinů mTOR a P70S6K (Johnson *et al.*, 2009).

Inhibice dráhy PI3K/Akt/mTOR byla v rámci vyšší míry autofagie často doprovázena zvýšenou aktivitou signální dráhy ERK1/2. Zvýšená aktivita ERK1/2 byla pozorována u buněk děložního leiomyosarkomu (Li *et al.*, 2013) nebo maligního gliomu, kde kurkumin snižoval fosforylaci PP1 (protein fosfatase 1), která inaktivuje ERK 1/2 (Aoki *et al.*, 2007). Komplexní a dosud ne zcela objasněnou úlohu autofagie v nádorovém procesu dokládá studie Zannotto-Filho a kol. (2015), v rámci které byl na buňky glioblastomu aplikován kurkumin, což bylo nejprve spojeno s aktivací autofagie a následně i apoptózy. Použití inhibitorů autofagie vedlo k nárůstu citlivosti buněk ke kurkuminu a přispělo tak k výraznému zvýšení míry apoptózy. Navíc bylo pozorováno, že

k aktivaci autofagie není, v důsledku aplikace kurkuminu, zapotřebí signální dráha PI3K, ale jen dráha ERK 1/2. Z výše uvedeného vyplývá, že protinádorové působení kurkuminu v souvislosti s aktivací procesu autofagie je značně rozdílné a je třeba jej dále objasnit.

3.4 Další mechanismy ovlivňující karcinogenezi

Zastavení buněčného cyklu, indukce apoptózy a autofagie nejsou jedinými mechanismy, kterými může kurkumin bránit vzniku a rozvoji nádorového onemocnění. V následujících kapitolách budou shrnuty další mechanismy ovlivňující karcinogenezi, tj. angiogeneze, imunitní systém či oxidační stres.

3.4.1 Angiogeneze

Angiogeneze je fyziologický proces tvorby nových krevních kapilár, který probíhá hlavně v embryonálním stádiu, zatímco v dospělém věku se uplatňuje zejména při hojení ran nebo v rámci ženského reprodukčního cyklu. Angiogeneze je zcela zásadní v souvislosti s rozvojem nádorového onemocnění, neboť dostatečné cévní zásobení je podmínkou pro expanzivní růst primárního nádoru (shrnutí v Hanahan and Weinberg, 2011).

3.4.1.1 Vliv kurkuminu na angiogenezi

Angiogenezi pozitivně ovlivňují proteiny VEGF (vascular endothelial growth factor) nebo FGF (fibroblast growth factor) Snížení genové exprese obou faktorů, které bylo doprovázeno snížením buněčné proliferace, bylo pozorováno po aplikaci kurkuminu *in vitro* podmínkách u buněk karcinomu plic (Lin *et al.*, 2009), prsu (Ferreira *et al.*, 2015) či prostaty (Aditya *et al.*, 2014). Inhibice buněčné proliferace po aplikaci kurkuminu byla pozorována také u buněčné linie střevního endotelu v důsledku snížení aktivity VEGF, se současnou inhibicí transkripce COX-2 (cyklooxygenase-2), která se účastní regulace angiogeneze prostřednictvím tvorby prostanooidů, které specificky ovlivňují tvorbu kapilár (Binion, Otterson and Rafiee, 2008).

Na modelu adenokarcinomu prsu bylo prokázáno, že genová exprese VEGF může být stimulována osteopontinem. Aplikace kurkuminu na buňky vedla k inhibici osteopontinu a následnému snížení produkce VEGF, což bylo ve výsledku doprovázeno inhibicí angiogeneze (Chakraborty *et al.*, 2008). Snížení tvorby nových krevních kapilár

doprovázené zmenšením velikosti primárního nádoru po podání kurkuminu bylo pozorováno také *in vivo* na myších modelech karcinomu prsu (Ferreira *et al.*, 2015) či děložního čípku (Yoysungnoen-Chintana, Bhattarakosol and Patumraj, 2014).

Negativním regulátorem angiogeneze je protein TSP-1 (thrombospondin-1), který interaguje s membránovými receptory endoteliálních buněk a funguje jako supresor proangiogenních faktorů. Zvýšení genové exprese TSP-1 bylo po podání kurkuminu pozorováno *in vivo* například u myši s gliomem (Zhang *et al.*, 2017).

3.4.2 Oxidační stres a produkce ROS

Oxidační stres se v buňce rozvíjí v případě nerovnováhy mezi mitochondriální produkcí reaktivních kyslíkových radikálů (ROS; Reactive oxygen species), zejména superoxidového aniontu, peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu a antioxidačních látek, které radikály neutralizují. Důsledkem oxidačního stresu je poškození buněčných proteinů, lipidů a dalších molekul včetně DNA. Zvýšená produkce ROS a oxidační stres může mít na nádorové buňky dvojitý efekt. V důsledku zvýšeného vzniku mutací přispívají ROS k nádorové transformaci, současně ale mohou indukovat vnitřní apoptotickou dráhu. V následujících kapitolách bude popsán vztah kurkuminu a antioxidačního působení a zvýšení produkce ROS (Reuter *et al.*, 2011)

3.4.2.1 Antioxidační působení kurkuminu

Fujisawa a kol. (2004) pozoroval antioxidační působení samotného kurkuminu, který u adenokarcinomu submandibulární žlázy přímo interagoval s peroxidovými radikály a neutralizoval je. Kurkumin ovlivňoval i produkci antioxidantů, látek neutralizujících působení ROS, které mohou být enzymatické (superoxid dismutáza, glutathion reduktáza, glutathion peroxidáza) nebo neenzymatické povahy (glutathion). Zvýšení produkce antioxidačních enzymů, konkrétně glutathion-S-transferázy a quinín reduktázy bylo po aplikaci kurkuminu pozorováno *in vivo* u myši (Iqbal *et al.*, 2003). U endotelových buněk vedla aplikace kurkuminu ke zvýšení produkce HO-1 (Hemoxygenase-1), která neutralizuje ROS (Mottetli *et al.*, 2000).

3.4.2.2 Vliv kurkuminu na produkci ROS

Aplikace kurkuminu byla spojena se zvýšením produkce ROS a indukci apoptózy např. u buněk T-lymfomu (Khan, Gahlot and Majumdar, 2012), adenokarcinomu střev (Su

et al., 2006), myeloidní leukémie (Larasati *et al.*, 2018) či osteosarkomu (Chang, Xing and Yu, 2014.) Zvýšení produkce ROS bylo po aplikaci kurkuminu pozorováno i na buňkách adenokarcinomu tlustého střeva, což vedlo ke snížení buněčné proliferace a indukci apoptózy, která na rozdíl od předchozích případů nebyla iniciována přes mitochondrie a protein p53 (viz kap. 3.2.1), (Agarwal *et al.*, 2018). Zvýšení oxidačního stresu a snížení buněčné proliferace v důsledku narušení buněčné redoxní homeostázy bylo pozorováno také u buněk karcinomu žaludku. Zde bylo podání kurkuminu, kromě navýšení ROS, doprovázeno snížením množství mitochondriální DNA a DNA-polymerázy γ (Wang *et al.*, 2017).

3.4.3 Vliv kurkuminu na další proteiny

Kurkumin působil v jistých buněčných nádorových liniích i na další skupiny proteinů a signálních drah. Jedná se např. o transkripční faktory STAT (signal transducer and activator of transcription), NF- κ B (nuclear factor-kappa B) a prozánětlivé cytokiny-interleukiny (IL).

3.4.3.1 Vliv kurkuminu na funkci proteinů STAT

Proteiny STAT jsou cytoplazmatické transkripční faktory regulující zánět a imunitní systém. Jsou aktivovány pomocí JAK (Januse kinase) kináz a směřují do jádra, kde zvyšují genovou expresi a podporují rozvoj zánětu, který, mimo jiné, podporuje růst a invazivitu nádorových buněk. Zvýšená produkce proteinů STAT hraje klíčovou roli v nádorech podléhajících zánětu, jako je rakovina vaječníků a dělohy.

Aplikací kurkuminu na zmíněné nádory dochází ke zvýšení exprese PIAS-3 (protein inhibitor of activated STAT-3) a inhibici fosforylace STAT-3, díky čemuž se snižuje progres nádroru (Saydmohammed, Joseph and Syed, 2010).

Ke zvýšení exprese PIAS-3 po podání kurkuminu dochází i u buněk rakoviny plic (Abbas *et al.*, 2015). Jelikož jsou transkripční faktory STAT součástí signální dráhy regulované pomocí JAK kináz byla pozorována jejich inaktivace prostřednictvím inhibice exprese JAK např. u myeloidní leukemie (Blasius *et al.*, 2006) nebo u karcinomu hlavy a krku (Hu *et al.*, 2015).

3.4.3.2 Vliv kurkuminu na NF- κ B a interleukiny

NF- κ B je transkripční faktor skládající se ze dvou podjednotek, které ovlivňují expresi genů důležitých pro imunitní odpověď buňky. Na základě různých stimulů je aktivován prozánětlivými cytokiny. V nádorových buňkách je tento mechanismus narušen a NF- κ B je často exprimován v nadbytečném množství (shrnutí v Dolcet *et al.*, 2005).

Kurkumin snižuje aktivaci NF- κ B *in vitro* u nádorové linie jater (Marquardt *et al.*, 2015), *in vivo* u myši s melanomem (Marin *et al.*, 2007), anebo u slepičího modelu spontánního nádoru vaječníků, kde je inhibice zprostředkována pomocí defosforylace NF- κ B, čímž je blokována jeho translokace do jádra (Sahin *et al.*, 2018). Bylo pozorováno, že aplikací kurkuminu na buňky nádoru ústní dutiny dochází k výměně podjednotek NF- κ B (p50/50 na p50/65) a k blokaci jeho DNA vazebné aktivity (Mishra *et al.*, 2015). Aktivita NF- κ B byla inhibována i pomocí kurkuminem zvýšené exprese miRNA-98 (Liu *et al.*, 2017).

Ke zmírnění zánětu a inhibici karcinogeneze docházelo u myši s lymfomem, z důvodu snížené produkce a aktivity interleukinů, kterou NF- κ B reguluje (Das and Vinayak, 2014). Snížení genové exprese NF- κ B a současně sérových hladin IL6, IL8, IL10, bylo pozorováno i v klinické studii s pacienty s karcinomem pankreatu (Dhillon *et al.*, 2008). Jak se zdá, kurkumin může snižovat aktivitu IL i jejich přímou blokací, jako je tomu u chondrosarkomu (Kalinski *et al.*, 2014). Dochází k tomu vazbou kurkuminu na interleukiny, neboť kurkumin mimikuje inhibitor anti-IL, jak bylo popsáno u IL2 (Oh, Hwang and Heo, 2018).

4 Invazivita nádorových buněk a tvorba metastáz

Většina pacientů, kterým je diagnostikováno nádorové onemocnění neumírá na primární nádor, ale v důsledku zdravotních komplikací způsobených tvorbou sekundárních nádorových ložisek-metastáz. Schopnost nádorové buňky metastázovat je podmíněna ztrátou mezibuněčných kontaktů a dalšími mechanismy, které buňce umožní procházet mezibuněčnou hmotou, případně i vrstvou jiných buněk, v důsledku čehož se buňka stává mobilní a může se šířit po organismu. Přestože výzkum v oblasti terapeutických možností inhibice tvorby metastáz v posledních letech velmi pokročil, je

stále většina pozornosti zaměřena na léčbu primárního nádoru (shrnutí v Alizadeh, Shiri and Farsinejad, 2014). V následujících kapitolách bude popsán vliv kurkuminu na molekulární mechanismy spojené s tvorbou nádorových metastáz, se zaměřením na kadheriny a matrixové metaloproteinázy.

4.1 Kadheriny

V rámci tvorby metastáz je důležitým mechanismem EMT (epithelial-mesenchymal transition), díky které buňky migrují do okolní tkáně. Tento mechanismus závisí na funkci několika typů proteinů, z nichž nejdůležitější jsou kadheriny. Kadheriny jsou transmembránové glykoproteiny, které zprostředkovávají adhezi mezi buňkami. V nádorových buňkách je často pozorováno snížení nebo zvýšení jejich hladiny. V současné době je známo více než 20 typů kadherinů. V rámci aplikace kurkuminu jsou důležité kadheriny E a N. E-kadherin tvoří v epiteliálních buňkách spoje pomocí své koncové C-domény. N-kadherin se váže v mezenchymálních buňkách svojí cytoplasmatickou doménu s kateniny s pomocí vápenatých iontů. (shrnutí v Alizadeh, Shiri and Farsinejad, 2014).

4.1.1 Vliv kurkuminu na kadheriny

Kurkumin inhiboval expresi transkripčních faktorů jako jsou Twist, Snail, Slug a další, které inhibují produkci E-kadherinů. Zvýšení produkce E-kadherinu pomocí kurkuminem inhibovaného Slug genu bylo pozorováno u orálního karcinomu, kde vyskytuje i pozitivní korelace mezi genovou expresí E-kadherinů a proteinu p53 (viz kap. 3.2.1), (Lee *et al.*, 2015), která je nejspíše zapříčiněna schopností p53 inhibovat protein Snail (Lim, Kim and Jung, 2010). U plicního adenokarcinomu byla pozorována vyšší aktivace JNK, která zvyšovala expresi dalšího tumor supresorového genu HLJ1 (DnaJ-like heat shock protein 1). HLJ1 následně zvyšoval genovou expresi E-kadherinů (Chen *et al.*, 2008). U nasofaryngeálního karcinomu snižoval kurkumin translokaci transkripčního faktoru NF- κ B do jádra (viz kap. 3.4.3.2), což bylo spojeno se zvýšením genové exprese E-kadherinů (Wong *et al.*, 2010).

Dalším z pozorovaných mechanismů, které mohou vést ke zvýšení genové exprese E-kadherinu byla interakce kurkuminu s β -kateninem. Za fyziologických podmínek vytváří β -katenin komplex s E-kadherinem, což brání transportu β -kateninu do jádra.

V buněčné linii karcinomu prsu byla po aplikaci kurkuminu tvorba inhibována komplexu β -kateninu s E-kadherinem inhibicí genů, které podporují tvorbu metastáz včetně výše zmíněného transkripčního represoru Slug (Mukherjee *et al.*, 2014). Jedním z mechanismů, kterými by kurkumin mohl inhibovat tvorbu metastáz bylo rozrušení interakce β -kateninu s p300, která je nezbytná pro další signalizaci (Dar *et al.*, 2016).

Snížení genové exprese N-kadherinu doprovázené snížením invazivity, popř. i zvýšením apoptózy bylo po aplikaci kurkuminu pozorováno u buněk glioblastomu (Zhao *et al.*, 2017) a karcinomu tlustého střeva (Zhang *et al.*, 2018). Ke snížení exprese N-kadherinu po aplikaci kurkuminu mohlo docházet v důsledku snížení hladiny superoxid dismutázy (viz kap. 3.4.2.2), jak bylo popsáno u nádorových buněk pankreatu (Li *et al.*, 2018).

4.2 Matrixové metaloproteinázy

Matrixové metaloproteinázy (MMP, matrix metalloproteinase) jsou endopeptidázy, které mají schopnost degradovat proteiny extracelulární hmoty a jejich zvýšená exprese v nádorových buňkách je příčinou zvýšené mobility a tvorby metastáz. Aktivita MMP může být negativně regulována inhibitory TIMPs (tissue inhibitors of MMP), které se nekovalentně váží do jejich aktivního místa. V metastázách se uplatňují především MMP 2 a 9, které budou zmíněny v následující podkapitole (shrnutí v Deng, Verron and Rohanizadeh, 2016).

4.2.1 Vliv kurkuminu na MMP

U buněčné linie MDA-MB-231 zvyšoval kurkumin genovou expresi inhibitorů TIMPs 1, 2, 3 a 4, které zodpovídají za snížení aktivity MMP 2 a 9 (Hassan and Daghestani, 2012). U linie MCF-7 stejného typu nádoru pozorujeme, že ke snížení exprese MMP docházelo pomocí inhibice signální dráhy RhoA/ROCK (Ras homolog A/Rho-associated protein kinase), (Sun *et al.*, 2016). Pro aktivaci MMP 2 a 9 je důležitá MMP 7, která aktivuje inaktivní proMMP 2 a 9 (Yokoyama *et al.*, 2008). Aplikace kurkuminu *in vivo* u myši s ganglionem sítnice inhibovala MMP 7 zároveň se signální drahou RhoA/ROCK. V důsledku toho docházelo k inhibici MMP 2 a 9 a zpomalení tvorby metastáz (Lin *et al.*, 2010).

V procesu inhibice MMP hraje důležitou roli i signální dráha NF- κ B (viz kap. 3.4.3.2), jejíž snížená aktivita inhibovala MMP 2 a 9 např. u rakoviny plic (Tsai *et al.*, 2015). Jedním z mechanismů, kterým kurkumin inhiboval dráhu NF- κ B, bylo potlačení DNA vazebné aktivity NF- κ B a AP-1 (Woo *et al.*, 2005).

Ve studii Fan a kol. (2015) byl u buněčné linie rakoviny plic sledován vliv kurkuminu na signální dráhu PKC α /Nox-2/ROS/ATF-2. Aplikace kurkuminu snižovala fosforylaci ATF-2 (activating transcription factor-2), což bránilo jeho interakci s proteinem AP-1 (activator protein 1). Exprese MMP-9 a migrace buněk byla výsledně snížena. Jedním z dalších příkladů může být kurkuminem inhibovaná aktivita FAK (focal adhesive kinase), která je u nádorových buněk zvýšena, čímž přispívá k tvorbě metastáz.

Dále kurkumin inhiboval transkripční faktor STAT3 (viz kap. 3.4.3.1) nebo genovou expresi uPA (urokinase type plasminogen activator), jehož hladina pozitivně koreluje se schopností nádorové buňky tvořit metastázy (shrnutí v Deng *et al.*, 2016). Závěrem lze shrnout, že kurkumin inhiboval proces invazivity a migrace nádorových buněk na několika různých úrovních, což by u onkologických pacientů mohlo zpomalovat rozvoj metastáz.

5 Syntetické analogy kurkuminu a nanokurkumin

Jak bylo řečeno výše (viz kap. 2) využití kurkuminu v terapii nádorových onemocnění má řadu limitů zahrnujících rychlou eliminaci z organismu, hydrofobicitu, nízkou stabilitu nebo nízkou tkáňovou distribuci, která je při *per os* podání nižší než 1 %. V současné době tyto překážky můžeme obejít využitím chemicko-biologických strategií, včetně *de novo* syntézy kurkuminových analogů či tvorby nanočástic s obsahem kurkuminu (nanokurkumin), (shrnutí v Padhye *et al.*, 2010).

5.1 Syntetické analogy kurkuminu

Cílem změny molekulární struktury kurkuminu je vytvoření jeho syntetických analogů, které by vykazovaly lepší vlastnosti. Analog kurkuminu EF-24 je, oproti kurkuminu, lépe distribuován do tkání a výrazněji inhibuje buněčnou proliferaci, což bylo prokázáno u buněk karcinomu prsu. V *in vivo* podmínkách bylo po aplikaci analogu EF-24 pozorováno také snížení hladiny glutahionu, což bylo spojeno s vyšší endogenní produkcí

ROS a následnou apoptózou (viz kap. 3.4.2.) (Adams *et al.*, 2005). Zajímavá je schopnost tohoto analogu narušit stabilitu cytoskeletárního buněčného systému a indukovat tak buněčnou smrt, což je mechanismus, který nebyl u kurkuminu pozorován (Thomas *et al.*, 2008).

Další kurkuminový analog HO-3867 ve srovnání s kurkuminem snáze prostupoval do buňky. Aplikace HO-3867 na buňky karcinomu prsu, jater a tlustého střeva byla spojena se snížením buněčné proliferace a indukci apoptózy v důsledku aktivace nádorového supresoru p53 (viz kap. 3.2.1). Zajímavé je, že v tomto případě byla pozorována reaktivace mutovaného proteinu p53 na proteinové úrovni, ke které docházelo v důsledku kovalentní interakce zmíněného analogu a mutované formy p53 (Madan *et al.*, 2018). Lze tedy shrnout, že případné zařazení analogů kurkuminu do terapie nádorových onemocnění je velice slibné.

5.2 Nanokurkumin

Tvorba nanočástic s obsahem kurkuminu je strategií, kterou je možno dosáhnout vyšší biologické dostupnosti v důsledku zvýšení stability a rozpustnosti kurkuminu. V současné době se jako přenašeče používají nanokrystaly, lipidové, fosfolipidové a liposomové přenašeče (Yallapu, Jaggi and Chauhan, 2012).

In vitro byla aplikace nanokurkuminu na buňky meduloblastomu a glioblastomu spojena se zastavením buněčného cyklu na přechodu G2/M fáze a následnou apoptózou v důsledku aktivace proteinu p53 (viz kap. 3.2.1) (Lim *et al.*, 2011). Účinky nanokurkuminu byly ověřeny také v *in vivo* podmínkách. U myší s karcinomem prostaty vedlo jeho podání ke snížení hladiny antiapoptotických proteinů Mcl-1 (myeloid leukemia cell differentiation protein 1) a Bcl-xL (viz kapitola 3.2.3), což bylo spojeno s inhibicí buněčné proliferace a následně indukci apoptózy (Yallapu *et al.*, 2014). Snížení proliferace buněk karcinomu pankreatu u myší způsobené podáním nanokurkuminu bylo doprovázeno aktivací proteinu NF- κ B (viz kap. 3.4.3.2) a inhibicí MMP-9 (viz kap. 4.2) (Bisht *et al.*, 2010).

Dalším mechanismem je interakce částice Eudragit S100 s kurkuminem. U buněk karcinomu tlustého střeva tyto částice s kurkuminem specificky disociovaly a uvolňovaly

kurkumin až ve střevě v důsledku kyselého pH. Oproti použití samotného kurkuminu snižovala tato terapie až dvojnásobně buněčnou proliferaci (Prajakta *et al.*, 2009).

6 Závěr

Cílem předkládané bakalářské práce bylo shrnout současné poznatky o působení kurkuminu v procesu karcinogeneze a tvorby metastáz, a tudíž i jeho potenciální úloze v prevenci a terapii nádorových onemocnění, která dnes patří ve světě mezi nejčastější příčiny úmrtí. Vzhledem k pleiotropnímu působení kurkuminu při vzniku a rozvoji nádorového onemocnění se jeho užití v protinádorové terapii jeví slibně.

Kurkumin u nádorových buněk vedl k zastavení buněčného cyklu, přes regulaci cyklinů a cyklin-dependentních kináz, případně i jejich inhibitorů, jako jsou p21 či p27. Často docházelo přímo k indukci buněčné smrti, především apoptózy, která byla zprostředkována zvýšením aktivity proteinu p53, Bcl-2 a kaspáz. Alternativní formu buněčné smrti pozorovanou v důsledku aplikace kurkuminu představovala autofagie. Inhibice rozvoje nádorového onemocnění byla současně spojena s potlačením angiogeneze nebo zvýšením oxidačního stresu. Kurkumin byl efektivní i v pozdější fázi nádorového onemocnění, kdy inhiboval aktivitu a expresi MMP a kadherinů a potlačoval invazivitu a migraci nádorových buněk.

Navzdory výše uvedenému má aplikace kurkuminu v klinické praxi řadu limitů. Některé z nich mohou být překonány novými syntetickými analogy kurkuminu nebo použitím nanokurkuminu, které jsou oproti kurkuminu často účinnější.

V současné době se kurkumin jeví přinejmenším jako vhodný doplněk ke stávající protinádorové terapii.

7 Seznam literatury

Abbas, R. *et al.* (2015) 'PIAS3 expression in squamous cell lung cancer is low and predicts overall survival', *Cancer Medicine*, 4(3), pp. 325–332. doi: 10.1002/cam4.372.

Adams, B. K. *et al.* (2005) 'EF24, a novel synthetic curcumin analog, induces apoptosis in cancer cells via a redox-dependent mechanism', *Anti-Cancer Drugs*, 16(3), pp. 263–275. doi: 10.1097/00001813-200503000-00005.

Aditya, N. P. *et al.* (2014) 'Antiangiogenic effect of combined treatment with curcumin and genistein on human prostate cancer cell line', *Journal of Functional Foods*. Elsevier Ltd, 8(1), pp. 204–213. doi: 10.1016/j.jff.2014.03.014.

Agarwal, A. *et al.* (2018) 'Curcumin induces apoptosis and cell cycle arrest via the activation of reactive oxygen species-independent mitochondrial apoptotic pathway in Smad4 and p53 mutated colon adenocarcinoma HT29 cells', *Nutrition Research*. Elsevier Inc, 51(2018), pp. 67–81. doi: 10.1016/j.nutres.2017.12.011.

Alizadeh, A. M., Shiri, S. and Farsinejad, S. (2014) *Metastasis review: from bench to bedside*, *Tumor Biology*, 35(9), pp. 8483–8523. doi: 10.1007/s13277-014-2421-z.

Anto, R. J. *et al.* (2002) 'Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl', *Carcinogenesis*, 23(1), pp. 143–150. doi: DOI 10.1093/carcin/23.1.143.

Aoki, H. *et al.* (2007) 'Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas *in vitro* and *in vivo* through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways', *Mol Pharmacol*, 72(1), pp. 29–39. doi: 10.1124/mol.106.033167.

Berrak, Ö. *et al.* (2016) 'The inhibition of PI3K and NFκB promoted curcumin-induced cell cycle arrest at G2/M via altering polyamine metabolism in Bcl-2 overexpressing MCF-7 breast cancer cells', *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 77, pp. 150–160. doi: 10.1016/j.biopha.2015.12.007.

Binion, D. G., Otterson, M. F. and Rafiee, P. (2008) 'Curcumin inhibits VEGF-mediated angiogenesis in human intestinal microvascular endothelial cells through COX-2 and MAPK inhibition', *Gut*, 57(11), pp. 1509–1517. doi: 10.1136/gut.2008.152496.

Bisht, S. *et al.* (2010) 'Systemic Administration of Polymeric Nanoparticle-Encapsulated Curcumin (NanoCurc) Blocks Tumor Growth and Metastases in Preclinical Models of Pancreatic Cancer', *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(8), pp. 2255–2264. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0172.

Blasius, R. *et al.* (2006) 'Curcumin regulates signal transducer and activator of transcription (STAT) expression in K562 cells', *Biochemical Pharmacology*, 72(11), pp. 1547-1554. doi: 10.1016/j.bcp.2006.07.029.

Canavese, M., Santo, L. and Raje, N. (2012) 'Cyclin dependent kinases in cancer', *Cancer Biology & Therapy*, 13(7), pp. 451–457. doi: 10.4161/cbt.19589.

Chakraborty, G. *et al.* (2008) 'Curcumin suppresses breast tumor angiogenesis by abrogating osteopontin-induced VEGF expression', *Molecular Medicine Reports*, 1(5), pp. 641-646. doi:10.3892/mmr_00000005.

Chang, Z., Xing, J. and Yu, X. (2014) 'Curcumin induces osteosarcoma MG63 cells apoptosis via ROS/Cyto-C/Caspase-3 pathway', *Tumor Biology*, 35(1), pp. 753–758. doi: 10.1007/s13277-013-1102-7.

Chen, H.-W. *et al.* (2008) 'Curcumin Inhibits Lung Cancer Cell Invasion and Metastasis through the Tumor Suppressor HLJ1', *Cancer Research*, 68(18), pp. 7428–7438. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6734.

Chipuk, J. E. *et al.* (2010) 'The BCL-2 Family Reunion', *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 37(3), pp. 299–310. doi: 10.1016/j.molcel.2010.01.025.

Choudhuri, T. *et al.* (2002) 'Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction', 512, pp. 334–340.

Choudhuri, T. *et al.* (2005) 'Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G2 phase of cell cycle in a p53-dependent manner', *Journal of Biological Chemistry*, 280(20), pp. 20059–20068. doi: 10.1074/jbc.M410670200.

Dar, M. S. *et al.* (2016) 'Terminal regions of β -catenin are critical for regulating its adhesion and transcription functions', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V., 1863(9), pp. 2345–2357. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.06.010.

Das, L. and Vinayak, M. (2014) 'Long-term effect of curcumin down-regulates expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 via modulation of E26 transformation-specific protein and nuclear factor- κ B transcription factors in livers of lymphoma bearing mice', *Leukemia and Lymphoma*, 55(11), pp. 2627–2636. doi: 10.3109/10428194.2014.889824.

Deng, Q. *et al.* (2018) 'Autophagy is a major mechanism for the dual effects of curcumin on renal cell carcinoma cells', *European Journal of Pharmacology*. Elsevier B.V., 826, pp. 24–30. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.02.038.

Deng, Y., Verron, E. and Rohanizadeh, R. (2016) 'Molecular Mechanisms of Anti-metastatic Activity of Curcumin', *Anticancer Research*, 36(11), pp. 5639–5648. doi: 10.21873/anticancer.11147.

Dhillon, N. *et al.* (2008) 'Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer', *Clinical Cancer Research*, 14(14), pp. 4491–4499. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0024.

Dolcet, X. *et al.* (2005) 'NF- κ B in development and progression of human cancer', *Virchows Archiv*, 446(5), pp. 475–482. doi: 10.1007/s00428-005-1264-9.

Elmore, S. (2007) 'Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death', *Toxicologic Pathology*, 35(4), pp. 495–516. doi: 10.1080/01926230701320337.

Fan, T. J. *et al.* (2005) 'Caspase family proteases and apoptosis', *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11), pp. 719–727. doi: 10.1111/j.1745-7270.2005.00108.x.

Fan, Z. *et al.* (2015) 'Curcumin inhibits the invasion of lung cancer cells by modulating the PKC α /Nox-2/ROS/ATF-2/MMP-9 signaling pathway', *Oncology Reports*, 34(2), pp. 691–698. doi: 10.3892/or.2015.4044.

Ferreira, L.C. *et al.* (2015) 'Effect of curcumin on pro-angiogenic factors in the xenograft

model of breast cancer', *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 15(10), pp. 1285-1296. doi: 10.2174/1871520615666150520093644.

Fujisawa, S. *et al.* (2004) 'Cytotoxicity, ROS-generation Activity and Radical-scavenging Activity of Curcumin and Related Compounds', *Anticancer Research*, 24(2 B), pp. 563-569.

Guan, F. *et al.* (2016) 'Curcumin suppresses proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells through autophagy-dependent Akt degradation', *PLoS ONE*, 11(1), pp. 1-18. doi: 10.1371/journal.pone.0146553.

Guo, L. Da *et al.* (2015) 'Curcumin combined with oxaliplatin effectively suppress colorectal carcinoma *in vivo* through inducing apoptosis', *Phytotherapy Research*, 29(3), pp. 357-365. doi: 10.1002/ptr.5257.

Gupta, S. C. *et al.* (2013) 'Discovery of curcumin, a component of the golden spic, and its miraculous biological activities', *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 39(3), pp. 283-299. doi: 10.1111/j.1440-1681.2011.05648.x.Discovery.

Gupta, S. C. *et al.* (2011) 'Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies', *Natural Products Report*, 28(12), pp. 1937-1955. doi:10.1039/c1np0051a.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) 'Hallmarks of cancer: The next generation', *Cell*. Elsevier Inc., 144(5), pp. 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hassan, Z. K. and Daghestani, M. H. (2012) 'Curcumin Effect on MMPs and TIMPs Genes in a Breast Cancer Cell Line', *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(7), pp. 3259-3264. doi: 10.7314/APJCP.2012.13.7.3259.

Hu, A., Huang, J.-J., *et al.* (2015) 'Curcumin as therapeutics for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma by activating SIRT1', *Scientific Reports*, 5(1). doi: 10.1038/srep13429.

Hu, A., Huang, J. J., *et al.* (2015) 'Curcumin suppresses invasiveness and vasculogenic mimicry of squamous cell carcinoma of the larynx through the inhibition of JAK-2/STAT-3 signaling pathway', *American Journal of Cancer Research*, 5(1), pp. 278-288.

Imamura, K. *et al.* (2001) 'Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-

ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287(2), pp. 562–567. doi: 10.1006/bbrc.2001.5627.

Iqbal, M. *et al.* (2003) 'Dietary Supplementation of Curcumin Enhances Antioxidant and Phase II Metabolizing Enzymes in ddY Male Mice: Possible Role in Protection against Chemical Carcinogenesis and Toxicity', pp. 33–38.

Janku, F. *et al.* (2012) 'Autophagy as a target for anticancer therapy', *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8, pp. 528–539. doi: 10.1038/nrclinonc.2011.71.

Johnson, S. M. *et al.* (2009) 'Curcumin inhibits proliferation of colorectal carcinoma by modulating Akt/mTOR signaling', *Anticancer Research*, 29(8), pp. 3185–3190. doi: 29/8/3185 [pii].

Kalinski, T. *et al.* (2014) 'Curcumin blocks interleukin-1 signaling in chondrosarcoma cells', *PLoS ONE*, 9(6). doi: 10.1371/journal.pone.0099296.

Kang, J. H. *et al.* (2015) 'Curcumin sensitizes human lung cancer cells to apoptosis and metastasis synergistically combined with carboplatin', *Experimental Biology and Medicine*, 240(11), pp. 1416–1425. doi: 10.1177/1535370215571881.

Khan, M. A., Gahlot, S. and Majumdar, S. (2012) 'Oxidative Stress Induced by Curcumin Promotes the Death of Cutaneous T-cell Lymphoma (HuT-78) by Disrupting the Function of Several Molecular Targets', *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(9), pp. 1873–1883. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0141.

Kim, J. Y. *et al.* (2012) 'Curcumin-induced autophagy contributes to the decreased survival of oral cancer cells', *Archives of Oral Biology*. Elsevier Ltd, 57(8), pp. 1018–1025. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.04.005.

Kunnumakkara, A. B. *et al.* (2017) 'Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases', *British Journal of Pharmacology*, 174(11), pp. 1325–1348. doi: 10.1111/bph.13621.

Larasati, Y. A. *et al.* (2018) 'Curcumin targets multiple enzymes involved in the ROS metabolic pathway to suppress tumor cell growth', *Scientific Reports*. Springer US, 8(1), pp. 1–13. doi: 10.1038/s41598-018-20179-6.

Lee, A. Y. L. *et al.* (2015) 'Curcumin Inhibits Invasiveness and Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma Through Reducing Matrix Metalloproteinase 2, 9 and Modulating p53-E-Cadherin Pathway', *Integrative Cancer Therapies*, 14(5), pp. 484–490. doi: 10.1177/1534735415588930.

Levine, A. J. (1997) 'P53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division', *Cell*, 88(3), pp. 323–331. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81871-1.

Levine, B. and Kroemer, G. (2008) 'Autophagy in the Pathogenesis of Disease', *Cell*, 132(1), pp. 27–42. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018.

Li, B. *et al.* (2013) 'Curcumin induces cross-regulation between autophagy and apoptosis in uterine leiomyosarcoma cells', *International Journal of Gynecological Cancer*, 23(5), pp. 803–808. doi: 10.1097/IGC.0b013e31828c9581.

Li, W. *et al.* (2018) 'Curcumin inhibits superoxide dismutase-induced epithelial-to-mesenchymal transition via the PI3K/Akt/NF- κ B pathway in pancreatic cancer cells', *International Journal of Oncology*, 52(5), pp. 1593–1602. doi: 10.3892/ijo.2018.4295.

Lim, K. J. *et al.* (2011) 'A polymeric nanoparticle formulation of curcumin inhibits growth, clonogenicity and stem-like fraction in malignant brain tumors', *Cancer Biology and Therapy*, 11(5), pp. 464–473. doi: 10.4161/cbt.11.5.14410.

Lim, S. O., Kim, H. and Jung, G. (2010) 'P53 inhibits tumor cell invasion via the degradation of snail protein in hepatocellular carcinoma', *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 584(11), pp. 2231–2236. doi: 10.1016/j.febslet.2010.04.006.

Lin, H. J. *et al.* (2009) 'Curcumin blocks migration and invasion of mouse-rat hybrid retina ganglion cells (N18) through the inhibition of MMP-2, -9, FAK, Rho A and Rock-1 gene expression', *Oncology Reports*, 23, pp. 665–670. doi:10.3892/or_00000682.

Lin, S. S. *et al.* (2009) 'Curcumin inhibits the migration and invasion of human A549 lung cancer cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)', *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 285(2), pp. 127–133. doi: 10.1016/j.canlet.2009.04.037.

Liontas, A. and Yeger, H. (2004) 'Curcumin and Resveratrol Induce Apoptosis and Nuclear Translocation and Activation of p53 in Human Neuroblastoma', *Anticancer Research*, 24(2

B), pp. 987–998.

Liu, W. L. *et al.* (2017) 'Curcumin inhibits LIN-28a through the activation of miRNA-98 in the lung cancer cell line A549', *Molecules*, 22(6). doi: 10.3390/molecules22060929.

Lu, P., Weaver, V. M. and Werb, Z. (2012) 'The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression', *Journal of Cell Biology*, 196(4), pp. 395–406. doi: 10.1083/jcb.201102147.

Madan, E. *et al.* (2018) 'The curcumin analog HO-3867 selectively kills cancer cells by converting mutant p53 protein to transcriptionally active wildtype p53', *Journal of Biological Chemistry*, p. jbc.RA117.000950. doi: 10.1074/jbc.RA117.000950.

Marin, Y. E. *et al.* (2007) 'Curcumin downregulates the constitutive activity of NF-kappaB and induces apoptosis in novel mouse melanoma cells', *Melanoma Res*, 17(5), pp. 274–283. doi: 10.1097/CMR.0b013e3282ed3d0e.

Marquardt, J. U. *et al.* (2015) 'Curcumin effectively inhibits oncogenic NF-κB signaling and retains stemness features in liver cancer', *Journal of Hepatology*, 63(3), pp. 661–669. doi:10.1016/j.hep.2015.04.018.

Masuelli, L. *et al.* (2017) 'Curcumin blocks autophagy and activates apoptosis of malignant mesothelioma cell lines and increases the survival of mice intraperitoneally transplanted with a malignant mesothelioma cell line', 8(21), pp. 34405–34422. doi: 10.18632/oncotarget.14907.

Mishra, A. *et al.* (2015) 'Curcumin modulates cellular AP-1, NF-kB, and HPV16 E6 proteins in oral cancer', *Ecancermedicalscience*, 9, pp. 1–12. doi: 10.3332/ecancer.2015.525.

Moos, P. J. *et al.* (2004) 'Curcumin impairs tumor suppressor p53 function in colon cancer cells', *Carcinogenesis*, 25(9), pp. 1611–1617. doi: 10.1093/carcin/bgh163.

Motterli, R. *et al.* (2000) 'Curcumin, an Antioxidant and Anti-Inflammatory Agent, Induces Heme Oxygenase-1 and Protects Endothelial Cells Against Oxidative Stress', *Free Radical Biology and Medicine*, 28(8), pp. 1303–1312.

Mou, S. *et al.* (2017) 'Curcumin inhibits cell proliferation and promotes apoptosis of laryngeal cancer cells through Bcl-2 and PI3K/Akt, and by upregulating miR-15a',

Oncology Letters, 14(4), pp. 4937–4942. doi: 10.3892/ol.2017.6739.

Mukherjee, S. *et al.* (2014) 'Curcumin inhibits breast cancer stem cell migration by amplifying the E-cadherin/beta-catenin negative feedback loop', *Stem Cell Res Ther*, 5(5), p. 116. doi: 10.1186/scrt506.

Oh, J. G., Hwang, D. J. and Heo, T. H. (2018) 'Direct regulation of IL-2 by curcumin', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd, 495(1), pp. 300–305. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.039.

Padhye, S. *et al.* (2010) 'Perspectives on chemopreventive and therapeutic potential of curcumin analogs in medicinal chemistry', *Mini reviews in medicinal chemistry*, 10(5), pp. 372–387. doi: 10.2174/138955710791330891.

Pan, W. *et al.* (2008) 'AMPK mediates curcumin-induced cell death in CaOV3 ovarian cancer cells', *Oncology Reports*, 20, pp. 1553–1559. doi:10.3892/or_00000179.

Park, C. *et al.* (2006) 'Induction of G2/M arrest and inhibition of cyclooxygenase-2 activity by curcumin in human bladder cancer T24 cells', *Oncology Reports*, 15(5), pp. 1225–1231. doi.org/10.3892/or.15.5.1225.

Park, W. *et al.* (2013) 'New perspectives of curcumin in cancer prevention', *Cancer Prevention Research*, 6(5), pp. 387–400. doi: 10.1158/1940-6207.

Pillai, G. R. *et al.* (2004) 'Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin', *Cancer Letters*, 208(2), pp. 163–170. doi: 10.1016/j.canlet.2004.01.008.

Prajakta, D. *et al.* (2009) 'Curcumin loaded pH-sensitive nanoparticles for the treatment of colon cancer', *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 5(5), pp. 445–455. doi: 10.1166/jbn.2009.1038.

Prasad, S. *et al.* (2017) 'Curcumin-free turmeric exhibits activity against human HCT-116 colon tumor xenograft: Comparison with curcumin and whole turmeric', *Frontiers in Pharmacology*, 8(12), pp. 1–11. doi: 10.3389/fphar.2017.00871.

Quispe-Soto, E. T. and Calaf, G. M. (2016) 'Effect of curcumin and paclitaxel on breast carcinogenesis', *International Journal of Oncology*, 49(6), pp. 2569–2577. doi: 10.3892/ijo.2016.3741.

Reuter, S. et al. (2011) 'Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?', *Free Radic Biol Med*, 49(11), pp. 1603–1616. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.Oxidative.

Romero-Hernández, M. A., et al. (2013) 'Toxic effects induced by curcumin in human astrocytoma cell lines', *Toxicology Mechanisms and Methods*, 23(9), pp. 650-659. doi: 10.3109/153765516.2013.826768.

Sa, G. and Das, T. (2008) 'Anti cancer effects of curcumin: Cycle of life and death', *Cell Division*, 3, pp. 1–14. doi: 10.1186/1747-1028-3-14.

Sahin, K. et al. (2018) 'Chemopreventive and antitumor efficacy of curcumin in a spontaneously developing hen ovarian cancer model', *Cancer Prevention Research*, 11(1), pp. 59–67. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-16-0289.

Salem, M., Rohani, S. and Gillies, E. R. (2014) 'Curcumin, a promising anti-cancer therapeutic: A review of its chemical properties, bioactivity and approaches to cancer cell delivery', *RSC Advances*, 4(21), pp. 10815–10829. doi: 10.1039/c3ra46396f.

Sato, T. et al. (2017) 'Phosphoproteomic Analysis Identifies Signaling Pathways Regulated by Curcumin in Human Colon Cancer Cells', *Anticancer Research*, 37(9), pp. 4789–4798. doi: 10.21873/anticancer.11885.

Saydmohammed, M., Joseph, D. and Syed, V. (2010) 'Curcumin suppresses constitutive activation of STAT-3 by up-regulating protein inhibitor of activated STAT-3 (PIAS-3) in ovarian and endometrial cancer cells', *Journal of Cellular Biochemistry*, 110(2), pp. 447–456. doi: 10.1002/jcb.22558.

Shehzad, A. et al. (2013) 'Curcumin induces apoptosis in human colorectal carcinoma (HCT-15) cells by regulating expression of Prp4 and p53', *Molecules and Cells*, 35(6), pp. 526–532. doi: 10.1007/s10059-013-0038-5.

Shi, M. et al. (2006) 'Antiproliferation and apoptosis induced by curcumin in human ovarian cancer cells', 30, pp. 221–226. doi: 10.1016/j.cellbi.2005.10.024.

Shieh, S. Y. *et al.* (1997) 'DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2', *Cell*, 91(3), pp. 325–334. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80416-X.

Singh, R. K. *et al.* (2015) 'The complex triad of combinatorial anticancer therapy: Curcumin, p53, and reactive oxygen species', *Clinical Medicine Insights: Therapeutics*, 7, pp. 63–69. doi: 10.4137/CMT.S33407.

Song, G. *et al.* (2005) 'Curcumin induces human HT-29 colon adenocarcinoma cell apoptosis by activating p53 and regulating apoptosis-related protein expression', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(12), pp. 1791–1798. doi: 10.1590/S0100-879X2005001200007.

Su, C.-C. *et al.* (2006) 'Curcumin-induced apoptosis of human colon cancer colo 205 cells through the production of ROS, Ca²⁺ and the activation of caspase-3.', *Anticancer research*, 26(6B), pp. 4379–89.

Sun, K. *et al.* (2016) 'Curcumin inhibits LPA-induced invasion by attenuating RhoA/ROCK/MMPs pathway in MCF7 breast cancer cells', *Clinical and Experimental Medicine*, 16(1), pp. 37–47. doi: 10.1007/s10238-015-0336-7.

Sun, S. H. *et al.* (2012) 'Cycle arrest and apoptosis in MDA-MB-231/Her2 cells induced by curcumin', *European Journal of Pharmacology*. Elsevier, 690(1–3), pp. 22–30. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.05.036.

Thomas, S. L. *et al.* (2008) 'EF24, a novel curcumin analog, disrupts the microtubule cytoskeleton and inhibits HIF-1', *Cell Cycle*, 7(15), pp. 2409–2417. doi: 10.4161/cc.6410.

Ting, C.-Y. *et al.* (2015) 'Curcumin Triggers DNA Damage and Inhibits Expression of DNA Repair Proteins in Human Lung Cancer Cells.', *Anticancer research*, 35(7), pp. 3867–73.

Tsai, J.-R. *et al.* (2015) 'Curcumin Inhibits Non-Small Cell Lung Cancer Cells Metastasis through the Adiponectin/NF- κ b/MMPs Signaling Pathway', *Plos One*, 10(12), p. e0144462. doi: 10.1371/journal.pone.0144462.

Wang, L. *et al.* (2017) 'Curcumin suppresses gastric tumor cell growth via ROS-mediated DNA polymerase γ depletion disrupting cellular bioenergetics', *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 36(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/s13046-017-0513-5.

Watson, J. L. *et al.* (2010) 'Curcumin-induced apoptosis in ovarian carcinoma cells is p53-independent and involves p38 mitogen-activated protein kinase activation and downregulation of Bcl-2 and survivin expression and akt signaling', *Molecular Carcinogenesis*, 49(1), pp. 13–24. doi: 10.1002/mc.20571.

Wong, T. S. *et al.* (2010) 'Curcumin alters the migratory phenotype of nasopharyngeal carcinoma cells through up-regulation of E-cadherin', *Anticancer Research*, 30(7), pp. 2851–2856. doi: 30/7/2851 [pii].

Woo, M. S. *et al.* (2005) 'Curcumin suppresses phorbol ester-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting the PKC to MAPK signaling pathways in human astrogloma cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 335(4), pp. 1017–1025. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.07.174.

Xu, X. *et al.* (2015) 'Curcumin induces the apoptosis of non-small cell lung cancer cells through a calcium signaling pathway', *International Journal of Molecular Medicine*, 35(6), pp. 1610–1616. doi: 10.3892/ijmm.2015.2167.

Yallapu, M. M. *et al.* (2014) 'Anti-cancer activity of curcumin loaded nanoparticles in prostate cancer', *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 35(30), pp. 8635–8648. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.06.040.

Yallapu, M. M., Jaggi, M. and Chauhan, S.C. (2012) 'Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer', *Drug discovery today*, 17(1-2), pp. 71–80. doi: 10.1016/j.drudis.2011.09.009.

Yamauchi, Y. *et al.* (2012) 'Curcumin induces autophagy in ACC-MESO-1 cells', *Phytotherapy Research*, 26(12), pp. 1779–1783. doi: 10.1002/ptr.4645.

Yang, J. *et al.* (2010) 'Curcumin reduces the expression of Bcl-2 by upregulating miR-15a and miR-16 in MCF-7 cells', *Medical Oncology*, 27(4), pp. 1114–1118. doi: 10.1007/s12032-009-9344-3.

Yang, J. *et al.* (2015) 'Effect of curcumin on Bcl-2 and Bax expression in nude mice prostate cancer', *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(8), pp. 9272–9278.

Yokoyama, Y. *et al.* (2008) 'Matrilysin (MMP-7) is a novel broadly expressed tumor antigen recognized by antigen-specific T cells', *Clinical Cancer Research*, 14(17), pp. 5503–

5511. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4041.

Yoysungnoen-Chintana, P., Bhattarakosol, P. and Patumraj, S. (2014) 'Antitumor and antiangiogenic activities of curcumin in cervical cancer xenografts in nude mice', *BioMed Research International*, 2014. doi: 10.1155/2014/817972.

Yu, X. *et al.* (2016) 'Curcumin exerts antitumor effects in retinoblastoma cells by regulating the JNK and p38 MAPK pathways', *International Journal of Molecular Medicine*, 38(3), pp. 861–868. doi: 10.3892/ijmm.2016.2676.

Zanotto-Filho, A. *et al.* (2015) 'Autophagy inhibition improves the efficacy of curcumin/temozolomide combination therapy in glioblastomas', *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 358(2), pp. 220–231. doi: 10.1016/j.canlet.2014.12.044.

Zhang, C. *et al.* (2018) 'Curcumin reverses irinotecan resistance in colon cancer cell by regulation of epithelial-mesenchymal transition', *Anti-Cancer Drugs*, 29(4), pp. 334–340. doi: 10.1097/CAD.0000000000000599.

Zhang, J. *et al.* (2010) 'Curcumin promotes apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through miR-186* signalling pathway', *Oncology Reports*, 24, pp. 1217–1223. doi:10.3892/or_00000975.

Zhang, J. *et al.* (2014) 'Inactivation of FoxM1 transcription factor contributes to curcumin-induced inhibition of survival, angiogenesis, and chemosensitivity in acute myeloid leukemia cells', *Journal of Molecular Medicine*, 92(12), pp. 1319–1330. doi: 10.1007/s00109-014-1198-2.

Zhang, Z. *et al.* (2017) 'Curcumin suppresses tumor growth and angiogenesis in human glioma cells through modulation of vascular endothelial growth factor/angiopoietin-2/thrombospondin-1 signalling', *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 16(3), pp. 346–350

Zhao, G. *et al.* (2016) 'Curcumin induces autophagy, inhibits proliferation and invasion by downregulating AKT/mTOR signaling pathway in human melanoma cells', *Oncology Reports*, 35(2), pp. 1065–1074. doi: 10.3892/or.2015.4413.

Zhao, J. *et al.* (2017) 'Curcumin potentiates the potent antitumor activity of ACNU against glioblastoma by suppressing the PI3K/AKT and NF-κB/COX-2 signaling pathways',

OncoTargets and Therapy, 10, pp. 5471–5482. doi: 10.2147/OTT.S149708.

Zhao, Q. *et al.* (2018) 'Curcumin sensitizes lymphoma cells to DNA damage agents through regulating Rad51-dependent homologous recombination', *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier, 97(August 2017), pp. 115–119. doi: 10.1016/j.biopha.2017.09.078.

Zhao, Z. *et al.* (2015) 'Curcumin induces apoptosis in pancreatic cancer cells through the induction of forkhead box O1 and inhibition of the PI3K/Akt pathway', *Molecular Medicine Reports*, 12(4), pp. 5415–5422. doi: 10.3892/mmr.2015.4060.

Zhou, Q.-M. *et al.* (2017) 'Curcumin reduces mitomycin C resistance in breast cancer stem cells by regulating Bcl-2 family-mediated apoptosis', *Cancer Cell International*, 17(1), p. 84. doi: 10.1186/s12935-017-0453-3.

Zhou, Q. *et al.* (2011) 'Curcumin enhanced antiproliferative effect of mitomycin C in human breast cancer MCF-7 cells *in vitro* and *in vivo*', *Acta Pharmacologica Sinica*, 32(11), pp. 1402–1410. doi: 10.1038/aps.2011.97.